

# 論文要旨

## Association of Single Nucleotide Polymorphisms in Endothelin Family Genes with the Progression of Atherosclerosis in Patients with Essential Hypertension

〔 本態性高血圧患者における Endothelin I 関連  
遺伝子多型と動脈硬化進展の関連に関する研究 〕

安田 久代

### 【背景及び目的】

Endothelin-1 (ET-1)は血管内皮細胞やその他種々の組織で発現し、血管収縮や平滑筋細胞増殖作用等により動脈硬化進展に関与している。一方で近年になり、各遺伝子に存在する一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs)の違いが疾患の進行や薬剤効果に及ぼす影響が注目されている。本研究の目的は、各種の動脈硬化指標と本態性高血圧患者における ET-1 関連 (EDN-1、Endothelin A 型・B 型受容体、Endothelin converting enzyme; ECE) 遺伝子多型の関連を明らかにすることである。

### 【方法】

国立循環器病センター受診中で、インフォームド・コンセントが得られた本態性高血圧患者 630 人を対象とした。本研究は、ミレニアム・ゲノム・プロジェクト「遺伝子解析による高血圧等循環器疾患対策創薬推進事業」の一環として、当センターの倫理委員会より承認された。収縮期血圧 140mmHg 以上または拡張期血圧 90mmHg 以上、あるいは降圧薬内服中の患者を高血圧とみなし、糖尿病、高脂血症等の合併症も評価した。動脈硬化の指標として brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV)、頸動脈エコーによる intima-media thickness (IMT)、plaque score (PS)を用いた。ET-1 遺伝子 (*EDNI*)についてはダイレクト・シーケンスにより SNPs を同定し、Endothelin A 型 (*EDNRA*)、B 型受容体 (*EDNRB*)、ECE1 型 (*ECE1*)、2 型 (*ECE2*)各遺伝子に関しては National Center for Biotechnology Information の公開データベースである dbSNP から SNPs を選択した。最終的にそれぞれ両アレル頻度 5%以上を呈した SNPs に対して TaqMan PCR 法でタイピングを施行した。*EDNI* の 3 個、*EDNRA* の 1 個、*EDNRB* の 2 個、*ECE1* の 4 個、*ECE2* の 1 個の計 11SNPs をタイピングした。

### 【結果】

- (1) baPWV 及び頸動脈エコーパラメータ (mean IMT、max IMT、PS)は、いずれも年齢、血圧と有意な相関を示した。
- (2) ET-1 関連 SNPs 計 11 個において、baPWV、IMT、PS との関係を対象者全体、男女別で解析した。男性は、3 多型で多型により baPWV に差を認めた。多重検定に対する Bonferroni 補正後も *EDNRB*-rs5351 多型で

野生型に比べ変異型が有意に高値を示した。[野生型 AA (n=107); 1707±285 cm/s、ヘテロ AG (n=162); 1736±278cm/s、変異型 GG (n=65); 1882±333 cm/s、p=0.0044]

- (3) Mean IMT に関しては、多重検定に対する補正後に、男性で *EDNRA*-rs5333 多型が関与を示した。[野生型 TT (n=181); 0.821±0.160mm、ヘテロ TC (n=130); 0.816±0.146mm、変異型 CC (n=23); 0.937±0.179mm、p=0.0253]
- (4) Max IMT については、補正後は男性においても多型の有意な関与を示さなかった。
- (5) PS に関しては PS10.1 以上と未満で動脈硬化進展、軽度の 2 群にわけ、遺伝子型の頻度を  $\chi^2$  検定で検討した。男性において、*EDNRB*-rs5351 多型、*ECE1*-rs2038089 多型で遺伝子型により PS の程度に差を認めたと、Bonferroni 補正後は有意水準を満たさなかった。
- (6) 女性では、補正後はどの動脈硬化指標に対しても、多型の関与は認めなかった。
- (7) baPWV、IMT、PS をそれぞれ動脈硬化進展、軽度の 2 群に分け、ET-1 関連遺伝子多型及び年齢、血圧等を含めたロジスティック回帰分析を施行した。男性で、Mean IMT への多型の関与は有意ではなかった。しかし、baPWV、PS の両指標に *EDNRB*-rs5351 多型が関与し、同多型が男性高血圧患者の動脈硬化進展に関与する可能性が強く示唆された。
- (8) 全例及び女性におけるロジスティック回帰分析では、11SNPs 全てにおいて、ET-1 関連遺伝子多型は baPWV、IMT、PS と有意な関連を示さなかった。
- (9) 遺伝子多型間の相乗効果をみるために、各動脈硬化指標に影響した 2 種の多型の相乗効果についても各々検討したが、単一の SNPs の効果以上の影響は認めなかった。

#### 【考察】

各動脈硬化指標と ET-1 関連遺伝子多型との間に、男性のみで有意な関連を認めた。その理由の一つとして、ET-1 の血管収縮や動脈硬化への作用の男女差が考えられる。これまでに ET-1 の血管収縮作用がラットの性別で異なることや、エストロゲンで減弱されること等の報告がある。今回の対象女性はほぼ 60 歳以上で、動脈硬化への閉経の影響は明確にできなかった。また、PS のほうが baPWV に比べ、より構造的な変化を示す等の各動脈硬化指標の特性の違いから、関連する遺伝子に差異を認めた可能性が考えられる。今回、高血圧患者において、ET-1 関連遺伝子多型により動脈硬化進展が異なったが、今後は降圧薬使用時に遺伝子多型を考慮して、投薬内容を決定することも必要になってくると思われる。

#### 【結論】

ET-1 関連遺伝子多型において、*EDNRB*-rs5351 多型が高血圧男性患者の動脈硬化に最も強く関与することが示唆された。

# 論文審査の要旨

報告番号	医論第 1458 号	氏名	安田 久代
審査委員	主査	上村 裕一	
	副査	嶽崎 俊郎	宮田 篤郎

## Association of single nucleotide polymorphisms in endothelin family genes with the progression of atherosclerosis in patients with essential hypertension

(本態性高血圧患者における Endothelin-1 関連遺伝子多型と動脈硬化進展の関連に関する研究)

Endothelin-1 (ET-1)は血管収縮や平滑筋細胞増殖作用等により動脈硬化進展に関与している。また近年、各遺伝子に存在する一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs)の違いが疾患の進行や薬剤効果に及ぼす影響が注目されている。本研究の目的は、本態性高血圧患者における動脈硬化指標とET-1関連 (Endothelin-1; *EDN-1*, Endothelin type A receptor; *EDNRA*, Endothelin type B receptor B; *EDNRB*, Endothelin Converting Enzyme1 型; *ECE1*, 2 型; *ECE2*)遺伝子多型の関連を明らかにすることである。

国立循環器病センター受診中のインフォームド・コンセントが得られた本態性高血圧患者 630 人を対象とした。糖尿病、高脂血症等の合併症や喫煙歴、降圧薬内服に関して評価した。動脈硬化指標として brachial-ankle pulse wave velocity (baPWV)、頸動脈エコーによる intima-media thickness (IMT)、plaque score (PS)を測定した。*EDN1* 遺伝子についてはダイレクト・シークエンスにより SNPs を同定し、*EDNRA*、*EDNRB*、*ECE1*、*ECE2* 各遺伝子に関しては National Center for Biotechnology Information の公開データベースである dbSNP から SNPs を選択した。最終的に両アレル頻度 5%以上を認めた SNPs に関して、*EDN1* の 3 個、*EDNRA* の 1 個、*EDNRB* の 2 個、*ECE1* の 4 個、*ECE2* の 1 個の計 11SNPs につき TaqMan PCR 法でタイピングを施行し、解析した。ET-1 関連遺伝子多型と各動脈硬化指標の値との関連性について評価したところ、男性例で baPWV と *EDNRB*-rs5351 多型、*ECE1*-rs212528 多型、*ECE1*-rs2038089 多型、mean IMT と *EDN1*-A201-4A/3A 多型、*EDNRA*-rs5333 多型、*EDNRB*-rs5351 多型、PS と *EDNRB*-rs5351 多型、*ECE1*-rs2038089 多型、女性例で mean IMT と *EDNRA*-rs5333 多型、*ECE2*-rs2272471 多型が関連していた。次に、各動脈硬化指標に強く関連している年齢、血圧などの交絡因子を加えても、ET-1 関連遺伝子多型が各動脈硬化指標に有意に関連しているかをロジスティック解析で評価した。男性例で *EDNRB*-rs5351 多型が、baPWV と PS の両指標と強く関連していた。一方、女性例ではどの多型もロジスティック解析後、各動脈硬化指標に関連しなかった。その原因として、ET-1 の作用の男女差や、性ホルモンの影響、各動脈硬化指標の特性の違いなどが考察しうる。従って、*EDNRB*-rs5351 多型は、男性本態性高血圧患者における動脈硬化進展に強く関連していることが証明された。

本研究で得られた新知見は以下の 3 点である。

1. 本態性高血圧男性患者において、exon 6 に存在する *EDNRB*-rs5351 多型は、動脈硬化進展に関連している。
2. ET-1 関連遺伝子多型と高血圧患者の動脈硬化進展との関連性には性差があり、女性では同様の関係を認めなかった。
3. 将来的には、これらの多型解析が高血圧あるいは動脈硬化患者の診療に有用になると思われる。

本研究は、Endothelin-1 関連遺伝子多型が男性本態性高血圧患者における動脈硬化進展に関連していることを示した報告であり、将来の性差医療やテーラーメイド医療の実現における基礎情報として有意義なものである。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 <b>1458</b> 号	氏名	安田 久代
審査委員	主査	上村 裕一	
	副査	嶽崎 俊郎	宮田 篤郎

主査および副査の3名は、平成20年8月19日、学位請求者 安田 久代君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) エンドセリンB型受容体は血管拡張など動脈硬化とは関係しない印象だが、エンドセリンA型受容体とB型受容体の分布では血管など動脈硬化に関連するところにB型受容体が多いのか？  
 (回答) B型受容体の働きはどちらかというと拡張だが、多型により働きが落ちている可能性がある。apoptosisなどへの関連も報告があり、それらが関連する可能性もあるが推論である。

質問2) 本研究で検討した Single nucleotide polymorphism (SNP)はアミノ酸の置換を伴わない非コード領域の SNP だが、実際にエンドセリン受容体の発現量が変わってくるというデータがあるのか？  
 (回答) 今回解析した SNP によりエンドセリン受容体の発現量が異なったというデータはないが、転写速度への影響などが関連しているのではないかと考えている。

質問3) 今後 SNP の解析をもとに投薬方法が変わる可能性があるか？  
 (回答) 今回、男性と女性で男性にのみ関連を認めた。その原因についてはエストロゲンとかアンドロゲンなどが関与していると思う。エンドセリンに限らず、他のホルモン系の作用も考慮した上で決定する必要がある、道のりは遠いと思う。現在降圧薬の単剤投与により、関連のある遺伝子多型を探し出す研究を進めており、関連する多型もかなり見つかってきている。薬剤の効果のない人や投与前などに、エンドセリンに限らず多型を調べることが実用化されていくと考えられる。

質問4) 男女差が興味深いが、男性の喫煙習慣と環境要因などの相互作用という見方はできないか？  
 (回答) 本論文ではロジスティック解析に喫煙歴を入れていなかったもので、後に喫煙歴をいれて解析しなおしたが、今回と同様の結果であった。但し御指摘のように、喫煙や仕事のストレスといった点も考慮しないと単純に多型の影響だけとは言いきれないのではないかと考えている。

質問5) 今回の対象者は高血圧患者だが、高血圧自体が動脈硬化のリスクファクターであり、そういった意味では、高血圧患者で解析すると効果が薄められる、あるいは逆に宿主因子をより明らかにできるという見方もできる。対象者の設定について考慮した点はあるか？  
 (回答) 今回は、単純に高血圧の方を対象とした。しかし、全く別の一般住民を対象とした研究もあるので、正常血圧の中で、今回問題となった多型の人の割合や、あるいは高血圧ではないけれども血圧が高い傾向はないのかなどを今後調べていきたいと考えている。

質問6) Pulse wave velocity (PWV)と Plaque score (PS)の違いは、functional な change と structural な change を反映しているのではないかとのことだが、今回の多型におけるリスクの出方から考えて、エンドセリンの動脈硬化への影響というものは、functional なものと structural なもの、あるいは収縮と増殖どちらが主な影響か？

(回答) PS との関連がよくでており、structural な影響が強いと考える。PWV も単に収縮という functional な因子だけではなく、血管自体の硬化も影響する。どちらの影響が強いかということについては今後更に検討したい。

質問7) 言葉の使い方として、SNPs の野生型と変異型という言葉使いに違和感がある。適切な日本語が思い浮かばないが、英語で major と minor というような言いかたをしたほうがいいと思う。

(回答) 御指摘ありがとうございます。今後の参考に致します。

質問8) エンドセリン-1 gene (EDN1)は自施設で配列を決定し、他の遺伝子多型は公開データベースから選択したのは何故か。自施設で解析するのが一番確実だが、労力もかかるため、公開データベ

ースから選択したのか？

(回答)当初より *EDNI* については関心があり、当施設で既にその SNPs を同定していた。*Endothelin type A receptor gene (EDNRA)* や *Endothelin type B receptor gene (EDNRB)*、*Endothelin converting enzyme-1 gene (ECE1)*、*Endothelin converting enzyme-2 gene (ECE2)* については、遺伝子も大きく、公開情報データベースも充実してきていたので、それらについてはデータベースを利用する形で選択した。

質問 9) この研究でエンドセリンの濃度を測定していないのはなぜか？

(回答)今回はある程度の人数的な方をまとめて測定するような形で行ったレトロスペクティブなスタディなので測定していない。本来であれば、エンドセリン濃度も測定したほうが多型の裏付けにもなりよかったと思うが、この研究においては行わなかった。

質問 10) エンドセリンの測定は臨床的にはどのように行われているのか？循環器内科領域でエンドセリンの濃度を測るといのは特殊な検査なのか？

(回答) pmol/l と非常に低濃度なので測定が難しく、一般的な検査ではない。

質問 11) 方法の 886 ページにある linkage disequilibrium (LD) はどのようなことを意味しているのか。多型を行うときにはこれを普通検索して行うのか？

(回答) LD とは連鎖不平衡のことで、ある遺伝子においてその配列があると、別のところの配列が決まることがある。今回は連鎖不平衡を考慮し、そのブロックの中で代表的な SNP を選び解析に用いた。連鎖不平衡を含めたハプロタイプ解析というような方法もあるが、今回は行わなかった。

質問 12) 884 ページに ET type A receptors blockers と書いてあるが、臨床的に使われているのか？

(回答) 非選択的エンドセリン受容体拮抗薬である bosentan は肺高血圧症の治療で使用されるが、一般的な高血圧治療では使用されない。

質問 13) 考察で述べられている、他の施設で調べられた SNP は今回調べたものと違うものか？

(回答) 今回解析した多型とは異なる。どの多型を選択するのかということは各施設で選んで測定しており、解析しようと思えばいくらかでも可能である。

質問 14) この論文では遺伝子多型を調べて診断に使うということだが、今後臨床的にどう応用される可能性があるのか？

(回答) 現在、Ca 拮抗薬、Angiotensin II receptor blocker (ARB)、利尿薬などの降圧薬をある一定期間単剤で使用し、内服前後の血圧を測定し、降圧薬の効果を前向きに調べ、対象者の遺伝子多型を調べている。その結果各降圧薬について、どの多型の影響が強いかということ調べている。一つの降圧薬につき 1000 から 2000 個残っているが、多型の選択が進んできており、それを解析して更に絞り込んでいく。そして個人毎の多型を調べるチップを作成し、薬の効果も予測可能なシステムができると思うが、まだ多型を絞り込んでいる状況である。

質問 16) 今回の研究でみつけた特殊な多型を持つ人に対する特殊な治療法というものはできないか？

(回答) 今回はほとんどが内服下であり、薬剤の影響の評価が不十分である。内服していない状態で同じ遺伝子多型について評価することが必要である。その上で、脂質異常症治療薬や降圧薬の効果で、PWV の改善などを評価すると、動脈硬化進展を予防するのに有意義かどうかはわかると思う。

質問 18) 多変量解析に Body mass index (BMI) ではなく、身長と体重を別々に使ったことには意味があるのか？

(回答) 特別な理由で BMI を除外したわけではなく、BMI をいれて確認したい。

質問 19) この *EDNRB*-rs5351 多型の他の施設でのアレル頻度はどうなのか。日本人特有とか、動脈硬化進展に特有という特徴があるのか？

(回答) 頻度としてはそれほど稀なものではないが、他の施設から同様な報告は今のところない。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。